

应用 16S rDNA 克隆文库技术研究长期稻草还田对水稻土细菌多样性的影响

王霞^{1,2}, 陈哲¹, 袁红朝¹, 吴敏娜¹, 魏文学¹, 吴金水¹, 秦红灵^{1,*}

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 亚热带农业生态过程重点实验室, 湖南 410125; 2. 华中农业大学资源与环境学院, 武汉 430070)

摘要: 利用中国科学院桃源农业生态试验站施肥制度长期定位试验田对照(CK)和稻草还田(OM)施肥处理的土壤样品, 应用 16S rDNA 克隆文库技术直接提取土壤微生物总 DNA, 分别构建细菌 16S rDNA 克隆文库, 并进行序列测定和分析。结果表明, 与对照(CK)相比, 稻草还田(OM)后土壤细菌群落结构发生了显著改变, 土壤细菌多样性和均匀度均有所降低。对照(CK)和稻草还田(OM)两个施肥处理的优势种群均为变形菌, 酸杆菌次之; 稻草还田减少了变形菌、疣微菌、绿弯菌和绿菌的分布, 而增加了硝化螺旋菌的分布。16S rDNA 系统发育分析则表明, 稻草还田对酸杆菌群落结构影响最大, 其次是疣微菌和 δ -变形菌。
关键词: 16S rDNA; 水稻土; 长期施肥; 细菌多样性; 系统发育分析

Effect of long-term fertilization by the application of rice straw on bacterial diversity in paddy soil

WANG Xia^{1,2}, CHEN Zhe¹, YUAN Hongzhao¹, WU Minna¹, WEI Wenxue¹, WU Jinshui¹, QIN Hongling^{1,*}

1 Key Laboratory for Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, CAS, Hunan 410125, China

2 College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Paddy soil bacterial community structure was studied through 16S rDNA gene. The soil samples were collected from the long-term fertilization experiment field at the Taoyuan Agro-ecosystem Research Station. Total microbial DNA was directly extracted from both treatments including amended with rice straw (OM) and CK. The clone libraries were constructed after cloning and sequencing. The result showed that the bacterial community composition of the paddy soil amended with rice straw (OM) was changed significantly compared with CK, both Shannon index and evenness decreased indicating its bacterial diversity was decreased. *Proteobacteria* were predominated both in rice straw (OM) and CK treatments, followed by *Acidobacteria*. Application of rice straw induced obvious decrease of the genotypes of *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* and *Chlorobi* compared to CK, in the contrast, the genotypes of *Nitrospira* increased. The phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences showed that application of rice straw varied the distribution of *Acidobacteria* greatest, followed by *Verrucomicrobia* and *Delta-Proteobacteria*. Therefore, application of rice straw had an important impact on bacterial community structure.

Key Words: 16S rDNA; rice straw; bacterial diversity; phylogenetic analysis

稻草还田是解决有机肥肥源和利用稻秆养分的有效方法^[1], 还田后的秸秆腐解可以改善和提高土壤质量、促进作物生长^[2-4], 而土壤微生物群落在秸秆腐解和营养元素释放过程中具有举足轻重的作用^[5]。土壤微生物多样性是衡量稻田生态系统功能是否正常的一个重要方面^[6-7], 早在 1945 年 Dawson 就报道了秸秆还

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40771115); 中国科学院“百人计划”资助项目(KZCX2-YW-BR-01); 国家科技支撑计划资助项目(2008BADA7B07)

收稿日期: 2009-05-29; 修订日期: 2009-07-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: huniu@isa.ac.cn

田浅耕处理与常规翻耕微生物多样性的变化^[8],2008 年周文新等采用平板涂抹法和 BIOLOG 检测法对晚稻田土壤微生物群落功能多样性进行研究^[9]。

近年来,运用不同方法对土壤微生物多样性的研究越来越多,其中土壤微生物中以细菌的种类和数量最多^[10],细菌多样性的研究受到广泛关注。由于土壤微生物群落结构组成复杂,数量巨大,对其研究的难度较大。传统的研究方法主要是纯培养技术,只能分离到 1%—10% 的微生物^[11-12],将会导致严重的微生物多样性信息的丢失。基于 16S rDNA 分子生物技术克服了传统培养技术的限制,能够快速、简便地获取包括土壤中可培养和未培养微生物的大部分信息,目前已经被广泛地应用于土壤微生物遗传多样性的研究^[13-14]。张建萍等^[15]应用 16S rDNA-RFLP 方法分析宁夏地区稻田土壤细菌的多样性,刘玮琦等^[16]应用 16S rRNA 基因文库技术分析菜田土壤细菌群落的多样性,均取得了很好的效果。

长期稻草还田必然带来土壤生物学性质的变化,尤其是最为敏感的土壤微生物群落结构将发生相应的变化,这将影响到土壤生态系统的功能发挥和结构的稳定。但目前有关这方面的研究鲜有人涉及,尤其是缺乏利用 DNA 分子生物技术对长期稻草还田下土壤微生物多样性的研究。因此,为探明长期稻草还田下稻田土壤细菌的多样性和群落结构组成情况,本研究从中国科学院桃源农业生态试验站施肥制度长期定位试验田采集土壤样品,提取土壤微生物总 DNA,通过构建 16Sr RNA 基因克隆文库,分析长期稻草还田下土壤细菌的群落组成,揭示稻草还田改善稻田土壤生产力的微生物学机理。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

土壤样品采自中国科学院桃源农业生态试验站(110°72"E, 28°52"N)施肥制度长期定位试验田,当地年平均气温 16.15℃,降雨量 1447.9mm,日照 1531.4h,太阳辐射 102.1×4.187kJ/cm²。实验地土壤属于第四纪红色粘土发育而成的水稻土,1990 年试验前土壤的基本理化性状为有机碳 15.4 g·kg⁻¹,全氮 1.88 g·kg⁻¹,全磷 0.60 g·kg⁻¹,全钾 12.8 g·kg⁻¹,速效磷 16.2 mg·kg⁻¹,速效钾 74.3 mg·kg⁻¹,pH 5.74。水稻种植方式是一年两季,早、晚稻供试品种分别为湘早籼 24 号和杂交金优 207。

本研究采集:1)施 N、P、K 化肥(CK);2)N、P、K 化肥+全量秸秆还田(OM)两个处理的土样样品。其中 OM 处理从 1990 年实验开始至今,每年将每季稻草收获后全部切成 10cm 长翻耕于各小区田中,早稻秸秆还田量 4221kg/hm²,晚稻秸秆还田量 5005kg/hm²。试验设 3 次重复,随机区组排列,小区面积为 4.1 m×8.1 m。1990—2006 年各处理早、晚稻化肥施用量及稻草秸秆 N、P、K 含量见表 1。

表 1 1990—2006 年各处理施肥量(kg/hm²)
Table 1 Fertilizer application levels in different treatments during 1990—2006

处理 Treatment		化肥 Fertilizer			稻草秸秆 ²⁾ Rice Straw		
		N	P	K	N	P	K
早稻	CK	72.9(112.5) ¹⁾	39.3(26.2)	70.2(56.0)			
	OM	63.5(112.5)	39.3(26.2)	70.2(56.0)	42.2	8.7	120.6
晚稻	CK	109.4(150.0)	0(13.09)	127.0(80.9)			
	OM	118.8(150.0)	0(13.09)	127.0(80.9)	46.2	10.4	128.0

注:1)括号内为 1990—1996 年间的化肥施用量,括号外为 1996 年后至今的化肥施用量;2)稻草秸秆 N、P、K 含量取 1990—2006 年的平均值

土壤样品采集于 2007 年 3 月(土壤处于冬闲期),采用对角线五点采样法,用土壤采样器采集每个小区中 5 个点的土壤样品。采样时,刮去表层约 2cm 土壤,采集深度 2—15cm。样品混匀后,除去根系、石块等杂物,一部分土样(约 200g)在田间立刻用锡箔纸包裹装入灭菌的布袋里后放入液氮冷冻,带回实验室后从液氮灌取出 -80℃ 保存,供分子生物学研究;另一部分土样(约 500g)装入灭菌的牛皮纸袋后带回实验室,风干或过 2mm 筛后 4℃ 保存,供土壤样品理化性状分析。土壤样品的理化性状见表 2。

1.2 土壤 DNA 的提取

参照 Proteous 等^[17] 和杨建等^[18] 的方法,采用 SDS-GITC-PEG 法,并作适当修改。称取 0.5g 土样于 2mL 离心管中,所加试剂均按照比例减少 20 倍,加入氯仿-异戊醇后离心速度改为 15 000g,离心时间 10min。其它操作步骤基本不变。

1.3 引物设计和 PCR 反应

根据细菌 16S rDNA 保守区域设计引物,所用的 35 个序列来自土壤细菌常见的 10 个属 (*Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*)。运用 Clustal W 软件分析后做 Alignment,并根据保守区域设计引物:上游引物 5'-ACAYTGGDACTGAGACACGG-3' 和下游引物 5'-GATTACTAGCGATTCCRRCTTC-3'。扩增目的基因的片段长度为 1050bp。

50 μ L PCR 反应体系包含 10 $\times$ PCR 缓冲液 (plus Mg^{2+}) 5 μ L; 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 10 μ mol/L 的上下游引物各 2 μ L; TaqDNA 聚合酶 2 U; 模板 100 ng; 加灭菌双蒸水至 50 μ L。PCR 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C, 预变性 5min; 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 50 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min。PCR 产物用经 EB 染色的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 扩增产物的克隆和测序

利用凝胶回收试剂盒 (Wizard SV gel and PCR clean-up system, Promega) 纯化 16S rDNA 基因片段, 然后通过 pGEM-T Vector System 试剂盒 (Promega) 连接在载体上, 转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞。涂布到含有氨苄青霉素 (Ampicillin)/IPTG/X-Gal 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 下培养 16—24 h, 白色克隆子即为阳性转化子。4 $^{\circ}$ C 保存, 备进一步 PCR 扩增用。

利用 T7 和 SP6 进行菌落 PCR, 筛选插入目的片断的阳性克隆子并直接利用菌液进行 DNA 序列测定, 构建克隆文库。测序反应由上海生工生物工程公司完成。

1.5 序列分析

将测序所得序列在 NCBI 中进行同源性比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 挑选与序列亲缘关系最相似序列, 再利用 CHECK-CHIMERA 软件分析检查去除嵌合及怪异序列^[19]。将测定的序列和部分网上下载的 16S rDNA 相似序列, 利用 Clustal X 1.83 和 Mega 4.0 软件分析多重比对结果, 采用邻接法 (Neighbor-Joining) 建构系统发育树。

将 16S rDNA 序列提交 GenBank 核苷酸数据库, 登记号在 FJ265080-FJ265528 中。

1.6 数据处理

采用 Shannon-Wiener 多样性指数: $H = - \sum (Pi) (\ln Pi)$; 均匀度指数: $E = H/H_{max}$ (其中 $H_{max} = \ln S$) 和覆盖率 $C = 1 - (n1/N)$ 进行多样性分析^[20]。利用 LIBSHUFF 软件比较不同的施肥处理下, 微生物多样性是否存在差异。此软件 (<http://LIBSHUFF.mib.uga.edu/>) 允许比较两个处理克隆文库间的差异, 并设定在 95% 的置信度区间内, 如果 $P < 0.05$, 说明两个处理间存在显著性差异, $P > 0.05$ 则说明两个处理间没有显著性差异^[21]。

表 2 两种不同施肥处理方式下稻田土壤的基本理化性质

Table 2 The physical and chemical properties of the soils

处理 Treatments	对照 CK	稻草还田 OM
有机质 Soil Organic Matter/(g/kg)	37.21b	47.16a
速效磷 Soil Available Phosphorus/(mg/kg)	15.00b	22.15a
速效钾 Soil Available Potassium/(mg/kg)	43.01b	152.90a
速效氮 Soil Available Nitrogen/(mg/kg)	132.42b	182.09a
微生物量碳 MBC/(mg/kg)	1026.2b	1232.94a
微生物量氮 MBN/(mg/kg)	79.45b	116.13a
全氮 Total Nitrogen/(g/kg)	1.90b	2.40a
全磷 Total Phosphorus/(g/kg)	0.62b	0.74a
pH	5.10a	5.05a
干筛团聚体百分含量 0—0.25mm	1.16	2.21
Content of dry >0.25—0.5mm	0.69	1.27
sieved aggregate >0.5—1mm	1.93	3.52
>1—2mm	1.1	1.56
>2—5mm	7.8	11.51
>5mm	87.32	79.92

注: $P < 0.05$ 水平下 LSD 检验, 相同的字母代表差异不显著的同一组

2 结果

2.1 细菌多样性指数

通过 Clustal W 软件比较 DNA 序列的相似性,将相似性大于 98% 的序列归为同一种可操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU)^[22]。对照 (CK) 和稻草还田 (OM) 两个施肥处理均挑选了 150 个 16S rDNA 克隆子,分别得到 134 和 111 个 OTU。对两个施肥处理的细菌 16S rDNA 多样性指数进行分析 (表 3),对照 (CK) 和稻草还田 (OM) 两个施肥处理的 Shannon 指数分别为 4.65 和 4.56,均匀度指数分别为 0.99 和 0.97,稻草还田后细菌的多样性和均匀度均有所降低。

表 3 稻田土壤细菌 16S rDNA 文库的多样性指数

Table 3 Diversity indices of bacterial 16S rDNA clone libraries from CK and OM

处理 Treatment	克隆数 Clone	基因型数 OTUs	Shannon 指数 Shannon Indices	均匀度指数 Evenness Indices
对照 CK	150	134	4.65	0.99
稻田还田 OM	150	111	4.56	0.97

进一步利用 Libshuff 软件分析两个克隆文库间的差异,结果表明 16S rDNA 克隆文库在对照 (CK) 和稻草还田 (OM) 处理之间存在极显著性差异 ($P < 0.01$),说明稻草还田后土壤细菌群落结构发生了显著的改变。

2.2 细菌 16S rDNA 序列分析

将测序所得 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行比对,得到对照和稻草还田两个施肥处理细菌的分类 (表 4),可以看出对照 (CK) 和稻草还田 (OM) 两个施肥处理中优势种群均为变形菌 (*Proteobacteria*),分别占其总克隆数的 42% 和 47%。酸杆菌 (*Acidobacteria*) 仅次于变形菌 (*Proteobacteria*),在稻田土壤中也有大量的分布,对照 (CK) 和稻草还田 (OM) 两个施肥处理中酸杆菌 (*Acidobacteria*) 分别占总克隆数的 19% 和 21%,稻草还田后酸杆菌 (*Acidobacteria*) 增加了 2%。此外,对照 (CK) 中细菌种类超过 10% 的还包括疣微菌 (*Verrucomicrobia*),占总克隆数的 11%,而稻草还田 (OM) 处理中细菌种类超过 10% 的还包括厚壁菌 (*Firmicutes*),占总克隆数的 13%。

稻田土壤微生物还包括绿弯菌 (*Chloroflexi*),芽单胞菌 (*Gemmatimonadetes*),放线菌 (*Actinobacteria*),拟杆菌 (*Bacteroidetes*),硝化螺旋菌 (*Nitrospirae*),浮霉菌 (*Planctomycetes*) 和绿菌 (*Chlorobi*)。他们在对照 (CK) 和稻草还田 (OM) 两个施肥处理中的分布均比较少,各类细菌占总克隆数的比例都小于 10%,绿菌 (*Chlorobi*) 在稻草还田 (OM) 施肥处理中没有被发现。另外,对照 (CK) 和稻草还田 (OM) 两个施肥处理中均有 3% 的细菌在 GenBank 中没有被明确的分类,属于未分类的菌。

与对照相比,稻草还田对变形菌数量分布的影响最大。从表 4 可以看出,稻草还田后变形菌比对照总体增加了 5%,其中 α -变形菌增加了 10%, β -变形菌减少了 5%。疣微菌受稻草还田的影响仅次于变形菌,与对照相比,稻草还田后疣微菌减少了 6%。另外,厚壁菌和绿弯菌受稻草还田的影响也比较大,与对照相比,稻草还田后,厚壁菌增加了 4%,而绿弯菌则减少了 4%。

表 4 稻田土壤细菌 16S rDNA 序列分析

Table 4 Sequence analysis of 16S rDNA clones from CK and OM

项目 Item	对照 CK		稻草还田 OM	
	克隆数 clone No	比例 /%	克隆数 clone No	比例 /%
Proteobacteria	63	42	70	47
α -Proteobacteria	17	11	32	21
β -Proteobacteria	14	9	6	4
γ -Proteobacteria	5	3	6	4
δ -Proteobacteria	27	18	26	17
Acidobacteria	29	19	31	21
Verrucomicrobia	17	11	8	5
firmicutes	14	9	19	13
Chloroflexi	7	5	2	1
Gemmatimonadetes	4	3	2	1
Actinobacteria	1	1	1	1
Bacteroidetes	3	2	5	3
Nitrospirae	2	1	4	3
Planctomycetes	3	2	4	3
Chlorobi	2	1	0	0
Unclassified	5	3	4	3
合计 Total	150	100	150	100

2.3 细菌系统发育分析

去除对照(CK)和稻草还田(OM)两个施肥处理间重叠的 12 个 OTUs,利用 Mega 4.0 对稻田土壤测序所得 233 个无重复的序列构建系统发育树(图 1)。从图 1 可见,稻田土壤 16S rDNA 细菌系统发育树可以划分为 7 个 Cluster,共形成了 11 处聚集(A-K),其中对照处理有 7 处聚集,稻草还田(OM)有 4 处,稻草还田后明显减少了某些菌种的集中分布。

从图 1 可见,Cluster 1 主要包括疣微菌(*Verrucomicrobia*),酸杆菌(*Acidobacteria*),放线菌(*Actinobacteria*),绿弯菌(*Chloroflexi*)和浮霉菌(*Planctomycetes*)。稻草还田对酸杆菌(*Acidobacteria*)的分布产生了明显的影响。首先,稻草还田明显减少了酸杆菌某些种类的分布,使对照(CK)中的细菌在 C 和 D 两处发生聚集,他们分别与 GenBank 登录序列 EU202742 (uncultured *Acidobacteriaceae* bacterium) 和 AJ519365 (uncultured *Holophaga* sp.) 有较高的相似率;另一方面,稻草还田也增加了酸杆菌某些种类的分布,使稻草还田(OM)处理中的细菌聚集在 E 和 F 两处,他们分别与 GenBank 登录序列 AJ519386 (uncultured *Holophaga* sp.) 和 AJ519379 (uncultured *Holophaga* sp.) 有较高的相似率。其次,稻草还田(OM)减少了疣微菌(*Verrucomicrobia*)在土壤中的分布,对照(CK)处理下疣微菌(*Verrucomicrobia*)产生了两块明显的聚集(见阴影部分 A 和 B)。聚集处 A 的细菌与 GenBank 登录序列 DQ088017 (uncultured *Verrucomicrobiaceae* bacterium) 有较高的相似率,聚集处 B 细菌与 GenBank 登录序列 AY395423 (uncultured *Xiphinematobacteriaceae* bacterium) 有较高的相似率。另外,绿弯菌(*Chloroflexi*)只在对照(CK)处理形成聚集(G),与 GenBank 登录序列 AY922044 (uncultured *Chloroflexi* bacterium) 有较高的相似率。

Cluster 2 主要包括厚壁菌(*Firmicutes*),硝化螺旋菌(*Nitrospirae*),绿菌(*Chlorobi*),拟杆菌(*Bacteroidetes*),芽单胞菌(*Gemmatimonadetes*)和放线菌(*Actinobacteria*)。稻草还田后,减少了绿菌(*Chlorobi*)的分布,而明显增加了硝化螺旋菌(*Nitrospirae*)的分布。从图 1 可见,硝化螺旋菌聚集在 H 处,主要来自于稻草还田(OM)处理,与 GenBank 登录序列 AF351231 (uncultured *Nitrospira* sp.) 有较高的相似率;绿菌(*Chlorobi*)在对照(CK)处理形成聚集 I,与 GenBank 登录序列 AJ519407 (uncultured *Chlorobi* bacterium) 有较高的相似率。

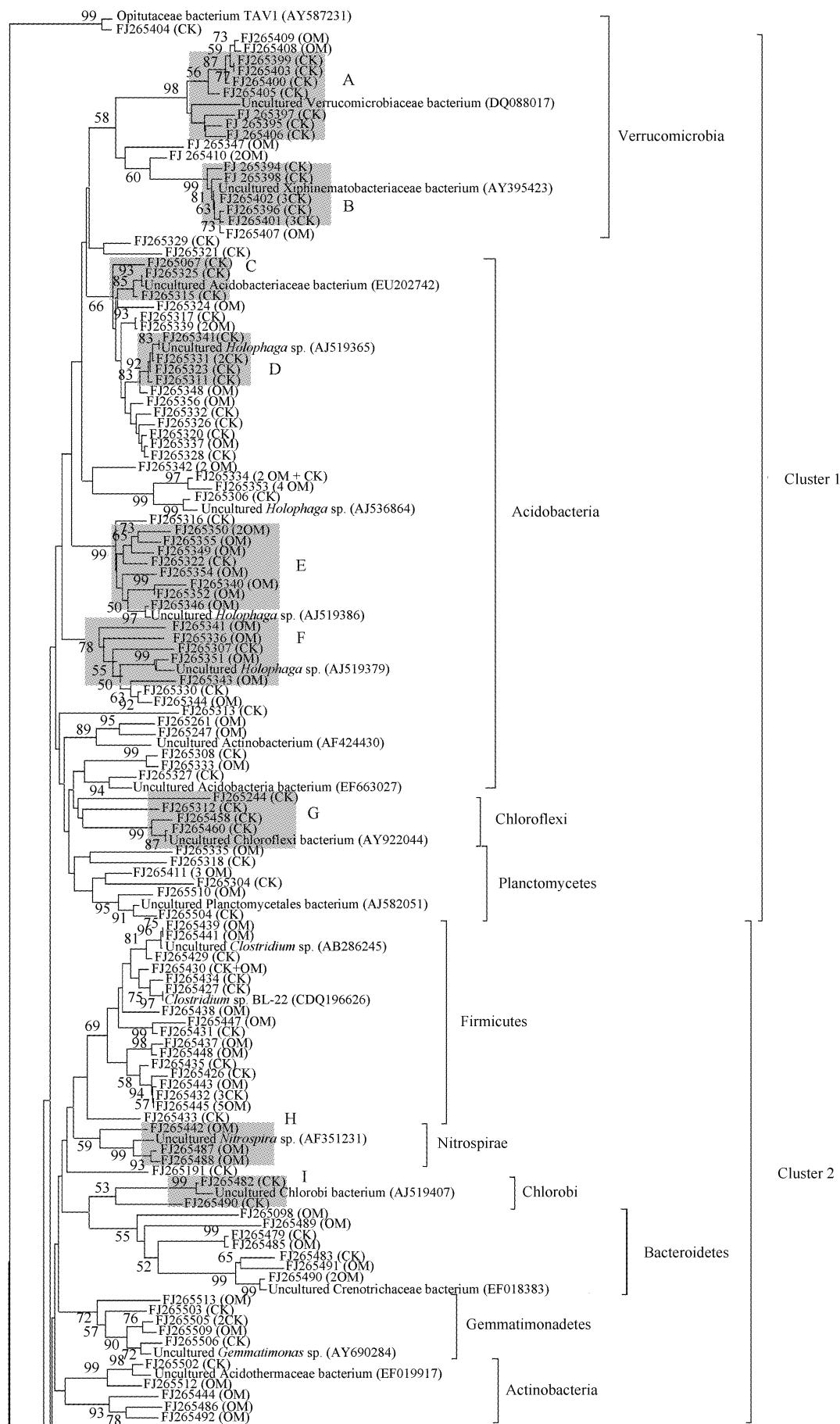
Cluster 3 和 Cluster 4 主要由变形菌(*Proteobacteria*)组成,其中 Cluster 3 包括 δ -变形菌(*Delta-Proteobacteria*)和 α -变形菌(*Alpha-Proteobacteria*),Cluster 4 包括 γ -变形菌(*Gamma-Proteobacteria*)和 β -变形菌(*Beta-Proteobacteria*)。变形菌(*Proteobacteria*)在稻田土壤中的分布相对比较均匀,稻草还田只对 δ -变形菌(*Delta-Proteobacteria*)在土壤中分布影响较大。由图 1 可见, δ -变形菌(*Delta-Proteobacteria*)在 Cluster 3 中产生了两外聚集 J 和 K。J 处的细菌主要来自于对照(CK)处理,他们与 GenBank 登录序列 AJ582683 (uncultured *Desulfobacteraceae* bacterium) 有较高的相似率;K 处的细菌主要来自于稻草还田(OM)处理,他们与 GenBank 登录序列 AB231802 (anaerobic syntrophic bacterium NE23-3) 有较高的相似率。

Cluster 5 和 Cluster 6 分别由硝化螺旋菌(*Nitrospirae*)和绿弯菌(*Chloroflexi*)组成,由于他们所包含的细菌数量均比较少,没有明显的聚集。剩下的 8 个 16S rDNA 序列属于 unclassified bacteria,划分为 Cluster 7。

与对照相比,稻草还田对酸杆菌(*Acidobacteria*)的分布影响最大,在系统发育树上形成 4 处聚集,2 处聚集于对照(CK)处理,2 处聚集于稻草还田(OM)处理;其次对疣微菌(*Verrucomicrobia*)和 δ -变形菌(*Delta-Proteobacteria*)的分布影响也较大,在系统发育树上各形成 2 处聚集。疣微菌(*Verrucomicrobia*)的 2 处聚集来源于对照(CK)处理, δ -变形菌(*Delta-Proteobacteria*)1 处聚集于对照(CK)处理,另一处聚集于稻草还田(OM)处理。另外,从系统发育树的分布来看,稻草还田后明显减少了疣微菌(*Verrucomicrobia*),绿弯菌(*Chloroflexi*)和绿菌(*Chlorobi*)的分布,而增加了硝化螺旋菌(*Nitrospira*)的分布。

3 讨论

多样性指数对于评价不同土壤的微生物群落多样性是非常有效的方法,高的多样性指数表明高的微生物群落多样性,它由种类的丰富度及种类的均匀度两部分组成^[23-24]。本研究结果表明,稻草还田(OM)后土壤细菌的群落结构发生了显著的变化,Shannon 指数和均匀度指数均比对照(CK)处理小(表 3),可见,稻草



续图 1 Fig. 1 continued

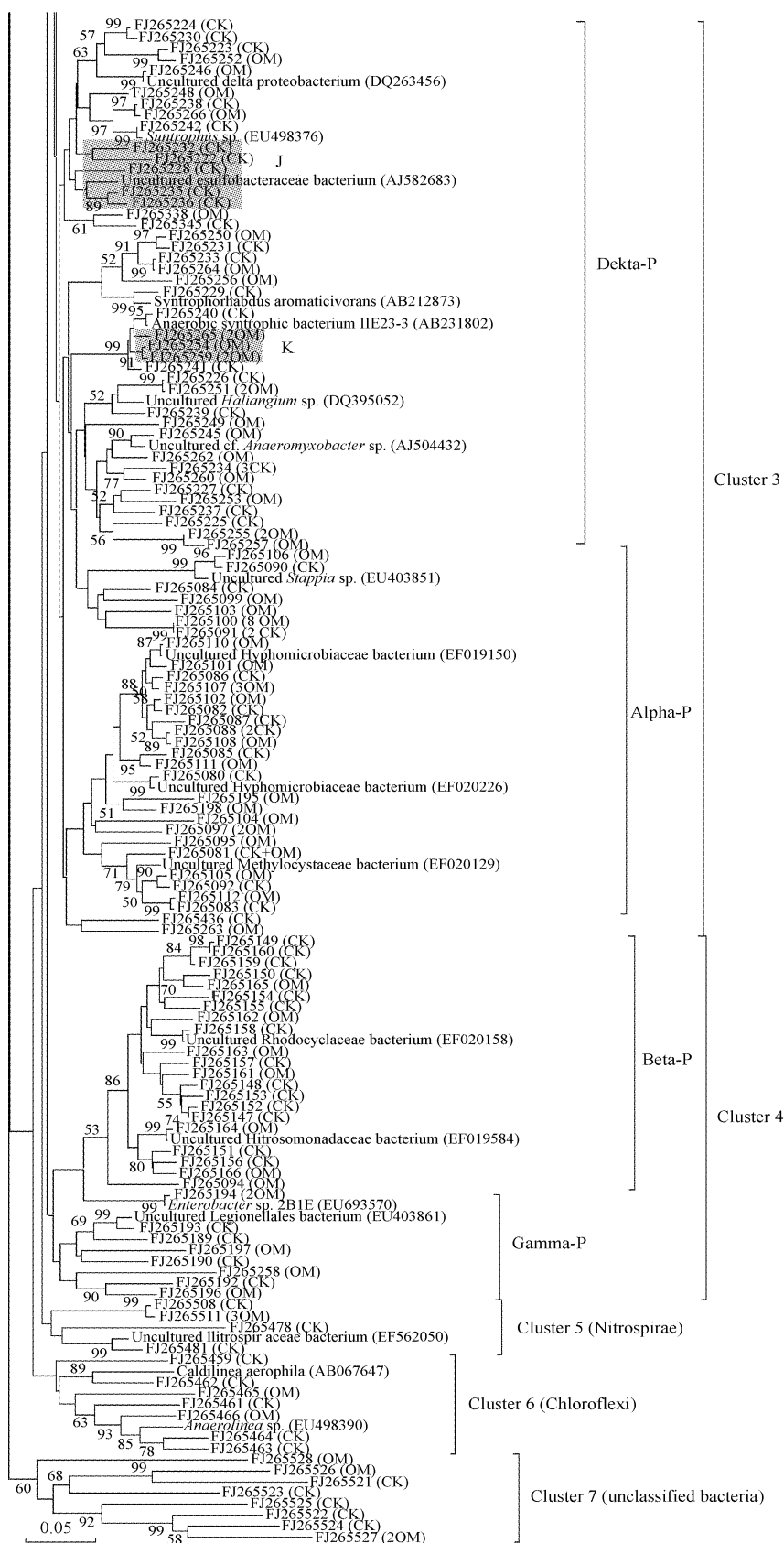


图 1 16S rRNA 基因克隆文库构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of the clones obtained from CK and OM
系统发育树采用邻接法构建;分支上的数值表示经 1000 次计算后的置信度值;比例标尺表示 5% 遗传距离

还田(OM)减少了细菌的多样性。大量研究表明,由于稻草中含有相当数量的碳、氮、磷、钾等营养元素,稻草还田后土壤肥力明显提高,微生物数量和多样性增加^[25-27]。结果显示,虽然稻草还田后土壤有机质,速效 N、P、K 养分,土壤微生物量 C、N 含量都比对照(CK)显著提高,但是细菌的多样性却减少了。这可能是由于本研究中对照(CK)处理属于当地常规的化学施肥方式,氮、磷、钾已经达到了平衡施肥的标准,经过近 20 多年长期施肥后,土壤微生物的群落结构已经比较稳定。由于土壤环境和微生物类群具有相互选择性^[28],稻草还田后,土壤化学性质发生显著的变化(表 2),增加了有些优势种群的数量,而相应减少了其他细菌的种类和数量,细菌的多样性因此而降低。

16S rDNA 序列分析表明,对照(CK)和稻草还田(OM)处理的优势种群都是变形菌(*Proteobacteria*),分别占到 42% 和 47%。Axelrood 等^[29]研究指出英国哥伦比亚森林土壤优势种群也是变形菌(46%: alpha 20.9%, gamma 14.3%, beta 10.4%)。针对于稻田土壤,Heiner 等^[30]研究发现在淹水的稻田土壤中,有氧地带是以变形细菌的两个亚类群 α -变形菌(*Alpha-Proteobacteria*)和 β -变形菌(*Beta-Proteobacteria*)为主;Sun 等^[31]研究表明在水稻土根部的微生物也是变形细菌占绝大部分,其中以 β -变形菌(*Beta-Proteobacteria*)居多。这些研究都和本研究结果相一致,表明土壤样品中变形菌是优势种群。另外,序列分析表明,稻田土壤中有较多的酸杆菌(*Actinobacteria*)分布,对照(CK)处理中占总克隆数的 19%,稻草还田(OM)处理中占 21%。这一结果与前人的一些研究相符合,即农耕土壤中变形菌和酸杆菌两个类群占主导地位^[32-35]。较多的酸杆菌可能与弱酸性的土壤环境有关,实验发现本研究稻田土壤 pH 值为 5.05—5.10,呈微弱酸性,有利于某些酸杆菌的生长。酸杆菌是新近分出的一类细菌,主要分布于陆地、海洋沉积物和活性淤泥等处^[36],大部分为不可培养的微生物。文库中所测序的克隆均与环境中未培养的酸杆菌相似性较高。

16S rDNA 系统发育图显示,与 CK 相比,稻草还田后土壤微生物的群落结构发生了明显的改变,形成不同的聚集块。CK 处理分别在疣微菌(*Verrucomicrobia*),酸杆菌(*Acidobacteria*),绿弯菌(*Chloroflexi*),绿菌(*Chlorobi*)和 δ -变形菌(*Delta-Proteobacteria*)形成 7 个聚集块;而 OM 处理只在酸杆菌(*Acidobacteria*),硝化螺旋菌(*Nitrospirae*)和 Delta-变形菌(*Delta-Proteobacteria*)形成 4 个聚集块。因此,稻草还田后明显减少了某些菌种(疣微菌,绿弯菌,绿菌)的分布,这一结果与稻草还田后细菌的多样性指数降低相一致。本研究还发现,稻草还田后,增加了硝化螺旋菌(*Nitrospira*)的分布。硝化螺旋菌(*Nitrospirae bacterium*)能够把 $\text{NO}_2\text{-N}$ 氧化成 $\text{NO}_3\text{-N}$,对增强土壤硝化作用,提高肥料的利用率有重要的作用^[37-38]。稻草还田后,土壤有机质含量增加,有可能提高和激发了土壤中部分硝化功能微生物活性,具体对硝化功能微生物多样性及分布的影响还需深入研究。

必须要指出的是,利用克隆文库很难获得整个细菌群落的信息,因为这要求建立庞大的克隆文库,不可能对所有的序列进行测序^[39-40]。本研究中对对照(CK)处理下克隆文库的覆盖率为 10.7%,稻草还田处理下为 26.0%,从数据所获得的细菌多样性信息并不能完全代表土壤细菌群落的真实状况。但是,利用 16S rDNA 序列测定的方法来分析微生物群落结构的方法已被广泛用来揭示土壤环境中细菌的多样性^[35,41-43],由于所测序列和所分析序列的有限,随机选择的克隆代表细菌群落中占统治地位的基因类型,已经可以反应土壤细菌的种类和多样性分布的概况。另外,本研究将相似性大于 98% 的序列归为同一种可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU),还有的研究将大于 95% 的或大于 97% 的序列归为同一种可操作分类单元^[44-46]。定义 OTU 时序列相似率越低,计算所得克隆文库的覆盖率就越高。如果本研究将相似率大于 95% 序列归为同一个 OTU,那么克隆文库的相似率将分别达到 22.7% 和 32.0%。因此,本研究随机挑选 150 个克隆分析细菌多样性结构,基本上可以反应水稻土稻草还田对土壤细菌多样性结构的影响。

References:

- [1] Qu H P, He J, Ning W J, Liu X H, Huang J, Gu M H. Application of rice straw in the field of rice production and research on progress. *Crops*, 2007, (6): 9-11.
- [2] Zhou J M, Xu D L, Xue C Y. Study of comprehensive utilization efficiency of returning rice straw to field. *Chinese Agricultural Science Bulletin*,

- 2002,18(4):7-10.
- [3] Qiu X X, Cai Y C, Lin Y, Zhang H. Effect of returning field of straws on the red soil fertility of ripe. *Soil and Fertilizer Science*, 2006, 22(1): 188-190.
- [4] She D L, Wang K R, Xie X L, Chen M, Lin Y H. Impact of incorporation of rice straw into the soil on soil fertility and yield. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2008, 16(1): 100-104.
- [5] Pang X, Zhang S F, Wang J G. Effect of different nitrogen levels on SMB-N and microbial activity. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2000, 10(4):476-480.
- [6] Collins H P, Rasmussen P E, Douglas C L J. Crop rotation and residue management effects on soil carbon and microbial dynamics. *Soil Science Society of America*, 1992, 56: 783-788.
- [7] Kent A D, Triplett E W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 2002, 56(10):211-236.
- [8] Dawson R C. Effect of crop residues on soil micropopulations, aggregation, and fertility under Maryland condition. *Soil Science Society of America Proceedings*, 1946, 10:180-184.
- [9] Zhou W X, Chen D L, Bu Y J, Tu N M. Effects of rice-straw returning to the field on the metabolic diversity of soil microbial communities. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(2):326-330.
- [10] Chen X R, Nan Z B. Bacterial diversity and its role in agricultural ecosystems. *Pratacul Tural Science*, 2002, 19(9):34-38.
- [11] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a nature community. *Nature*, 1990, 345(6270):63-65.
- [12] Tan Z J, Li Q, Li J G, Tu N M, Xiao Q M, Zhou Q M, Chen X. Effect of returning quantity of rice-straw to soil on quantities and activity of microbial in paddy soil. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(3):670-673.
- [13] Arcate J M, Karp M A, Nelson E B. Diversity of peronosporomycete (oomycete) communities associated with the rhizosphere of different plant species. *Microbial Ecology*, 2006, 51(1):36-50.
- [14] Saleena L M, Rangarajan S, Nair S. Diversity of Azospirillum strains isolated from rice plants grown in saline and nonsaline sites of coastal agricultural ecosystem. *Microbial Ecology*, 2002, 44(3):271-277.
- [15] Zhang J P, Dong N Y, Yu H B, Zhou Y J, Lu Y L, Di M M, Yu L Q. Bacteria diversity in paddy field soil by 16S rDNA-RFLP analysis in Ningxia. *Biodiversity Science*, 2008, 16(6):586-592.
- [16] Liu W Q, Mao Z C, Yang Y H, Xie B Y. Analysis of soil bacterial diversity by Using the 16S rRNA gene Library. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(10):1344-1350.
- [17] Proteous L A, Armstrong J L, Seidler R J, Watrud L S. An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. *Curr Microbiol*, 1994, 29(5):301-307.
- [18] Yang J, Hong K. Comparing study on different methods for DNA extraction from mangrove soil. *Biotechnology Bulletin*, 2006 (z1):366-371.
- [19] Cole J R, Chai B, Marsh T L, Farris R J. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(1):442-443.
- [20] Hughes J B, Bohannon B J M. Application of ecological diversity statistics in microbial ecology//Kowalchuk G A, de Bruijin F J, Head I M, *et al.*, eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd ed. Netherlands: Kluwer Academic, 2004: 1321-1344.
- [21] David R S, Michelle A F, Stephen L R, William B W. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9):4374-4376.
- [22] Stach J E, Maldonado L A, Masson D G, Ward AC, Goodfellow M, Bull A T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10):6189-6200.
- [23] Harch, B D, Harch B D, Meech W, Pankhurst C E, Correll R L. Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30(1):91-101.
- [24] Staddon W J, Duchesne L C, Trevors J T. Microbial diversity and community structure of postdisturbance forest soils as determined by sole-carbon-source utilization patterns. *Microbial Ecology*, 1997, 34(2):125-130.
- [25] Lao X R, Sun W H, Wang Z, Hao Y R, Zhang C A. Effect of matching use of straw and chemical fertilizer on soil fertility. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(4):618-623.
- [26] Chen Z L, Zhang F P, Cai X B, He J Q, Peng Y L. Effect of returning straws to field on microbes of degenerated soil in central Tibet. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(4):696-699.
- [27] Toyota K, Kuninaga S. Comparison of soil microbial community between soils amended with or with OTU farmyard manure. *Applied Soil Ecology*, 2006, 33(1):39-48.
- [28] Zhang W, Hu Y G, Huang G H, Gao H W. Soil microbial diversity of artificial peashrub plantation on North Loess Plateau of China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(5):751-756.
- [29] Axelrood P E, Chow M L, Radomski C C, McDermott J M, Davies J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(7):655-674.
- [30] Heiner L, Inko A, Werner L. Spatial Changes in the Bacterial Community Structure along a Vertical Oxygen Gradient in Flooded Paddy Soil Cores.

- Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 754-762.
- [31] Sun L, Qiu F, Zhang X, Song W, Dai X, Dong X Z, Song W. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. Microbial Ecology, 2008, 55(3): 415-424.
- [32] Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M H, Kirchmann H, Kandeler E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4215-4224.
- [33] Sun H Y, Deng S P, Raun W R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 5868-5874.
- [34] Tringe S G, von Mering C, Kobayashi A, Salamov A A, Chen K, Chang H W, Podar M, Short J M, Mathur E J, Detter J C, Bork P, Hugenholtz P, Rubin E M. Comparative metagenomics of microbial communities. Science, 2005, 308(5721): 554-557.
- [35] Ulrich A, Becker R. Soil parent material is a key determinant of the bacterial community structure in arable soils. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56(3): 43-44.
- [36] Schabereiter C G, Saiz J C, Pinar G, Lubitz W, Rolfe S. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. FEMS Microbiology Letters, 2002, 211(1): 7-11.
- [37] Burrell P, Keller J, Blackall L. Characterisation of the bacterial consortium involved in nitrite oxidation in activated sludge. Water Science and Technology, 1999, 39(6): 45-52.
- [38] Lee H W, Lee S Y, Lee J B, Park J B, Choi E S, Park Y K. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 41(2): 85-94.
- [39] von Wintzingerode F, Gobel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Review, 1997, 21(3): 213-229.
- [40] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, Welch D M, Huse, S M, Neal P R, Arrieta J M, Herndl G J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [41] Geng Y H, Wu J G, Li W H, Jiang Y. Advance of crop residues fertilize the soil. Journal of Jilin Agricultural University, 2000, 22(2): 76-85.
- [42] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. Soil Biol Biochem, 2003, 35(3): 453-467.
- [43] Zhou J Z, Davey M E, Figueras J B, Rivkina E, Gilichinsky D, Tiedje J M. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. Microbiology, 1997, 143(12): 3913-3919.
- [44] Wang M, Chen J K, Li B. Characterization of bacterial community structure and diversity in rhizosphere soils of three plants in rapidly changing salt marshes using 16S rDNA. Pedosphere, 2007, 17(5): 545-556.
- [45] Kima J S, Sparovek G, Longo R M, Wanderley D M. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(2): 684-690.
- [46] Li Z T, Li B L, Zhao Y, Ou J. The comparative analysis of microorganism diversity in two kinds of packaged chilled beef on sale. Microbiology, 2009, 36(1): 64-70.

参考文献:

- [1] 区惠平, 何佳, 宁伟军, 刘昔辉, 黄景, 顾明华. 稻草还田在水稻生产上的应用与研究进展. 作物杂志, 2007, (6): 9-11.
- [2] 周江明, 徐大连, 薛才余. 稻草还田综合效益研究. 中国农学通报, 2002, 18(4): 7-10.
- [3] 邱孝煊, 蔡元呈, 林勇, 张辉. 稻草还田对红壤性水稻土肥力的影响. 土壤肥料科学, 2006, 22(1): 188-190.
- [4] 余冬立, 王凯荣, 谢小立, 陈敏, 林蕴华. 稻草还田的土壤肥力与产量效应研究. 中国生态农业学报, 2008, 16(1): 100-104.
- [5] 庞新, 张福锁, 王敬国. 不同供氮水平对根际微生物量氮及微生物活度的影响. 植物营养与肥料学报, 2000, 10(4): 476-480.
- [9] 周文新, 陈冬林, 卜毓坚, 屠乃美. 稻草还田对土壤微生物群落功能多样性的影响. 环境科学学报, 2008, 28(2): 326-330.
- [10] 陈秀蓉, 南志标. 细菌多样性及其在农业生态系统中的作用. 草业科学, 2002, 19(9): 34-38.
- [12] 谭周进, 李倩, 李建国, 屠乃美, 肖启明, 周清明, 陈萱. 稻草还田量对晚稻土壤微生物数量及活度的动态影响. 农业环境科学学报, 2006, 25(3): 670-673.
- [15] 张建萍, 董乃源, 余浩滨, 周勇军, 陆永良, 耿锐梅, 余柳青. 应用 16S rDNA-RFLP 方法分析宁夏地区稻田土壤细菌的多样性. 生物多样性, 2008, 16(6): 586-592.
- [16] 刘玮琦, 郭振川, 杨宇红, 谢丙炎. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性. 微生物学报, 2008, 48(10): 1344-1350.
- [18] 杨建, 洪葵. 红树林土壤总 DNA 不同提取方法比较研究. 生物技术通报, 2006(增刊): 366-371.
- [25] 劳秀荣, 孙伟红, 王真, 郝艳如, 张昌爱. 秸秆还田与化肥配合施用对土壤肥力的影响. 土壤学报, 2003, 40(4): 618-623.
- [26] 陈芝兰, 张培平, 蔡晓布, 何建清, 彭岳林. 秸秆还田对西藏中部退化农田土壤微生物的影响. 土壤学报, 2005, 42(4): 696-699.
- [28] 张薇, 胡跃高, 黄国和, 高洪文. 西北黄土高原柠条种植区土壤微生物多样性分析. 微生物学报, 2007, 47(5): 751-756.
- [41] 耿玉辉, 吴景贵, 李万辉, 姜岩. 作物残体培肥土壤的研究进展. 吉林农业大学学报, 2000, 22(2): 76-85.
- [46] 李正堂, 李柏林, 赵勇, 欧杰. 两种包装市售冷却牛肉中微生物多样性的比较分析. 微生物学通报, 2009, 36(1): 64-70.